动 物 学 研 究 2003, Dec. 24 (6): 462~466 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research

5-HT 和 GnRH 及其受体在长牡蛎卵巢的生理作用机制——双染和免疫细胞化学定位

方永强[1], 翁幼竹, 刘丽丽, 方 琦, 戴燕玉
(国家海洋局第三海洋研究所, 福建 厦门 361005)

摘要: 用免疫细胞化学与双染技术对 5-HT 和 GnRH 及其受体在长牡蛎卵巢中的分布的研究结果揭示, 不同发育时期卵巢中卵母细胞均存在 5-HT 和 GnRH 受体, 受体阳性物质沿胞膜分布, 显深棕色, 核显免疫阴性反应; 5-HT 和 GnRH 及其受体共存于不同时期卵母细胞胞质和胞膜上。以上结果表明长牡蛎的卵母细胞不仅能产生 5-HT 和 GnRH, 而且能表达 5-HT 和 GnRH 的受体, 5-HT 和 GnRH 可能以自分泌的方式对卵母细胞起调节作用。

关键词: 长牡蛎; 卵巢; 5-HT; GnRH; 受体
中图分类号: Q959.215.3 **文献标识码**: A **文章编号**: 0254-5853(2003)06-0462-05

Mechanism of 5-HT and GnRH Physiological Action in the Ovary of *Crassostrea gigas*: Orientation of Double Staining and Immunocytochemistry

FANG Yong-qiang[1], WENG You-zhu, Liu Li-li, FANG Qi, DAI Yan-yu
(*Third Institute of Oceanography*, *State Oceanography Administration*, *Xiamen*, *Fujian* 361005, *China*)

Abstract: Distribution of 5-HT, GnRH and their receptors within ovaries of *Crassostrea gigas* was studied using the immunocytochemistry and double staining technique. The results revealed that ①5-HT and GnRH receptors existed in the oocytes of different development stages of the ovary; ②the reactive substances of 5-HT and GnRH receptors were distributed along the membrane of oocytes and showed dark brown, but nucleus showed immunonegative reaction; ③5-HT, GnRH and their receptors co-existed in the cytoplasm and membrane of oocytes of different development stages. The above results indicate that the oocytes of *Crassostrea gigas* can not only produce 5-HT and GnRH, but also express their receptors. 5-HT and GnRH may exert regulation action on the oocytes by autosecretion.

Key words: *Crassostrea gigas*; Ovary; 5-HT; GnRH; Receptor

Dehl et al (1966) 最先报道 5-羟色胺 (5-hydroxytryptamine, 5-HT) 分布在双壳类中枢神经系统和其他组织中。Matsutani & Nomura (1982, 1984, 1986) 进一步证实 5-HT 还存在于日本扇贝 (*Patinopecten yessoensis*) 中枢神经系统和性腺中, 并能诱导其产卵; 后来有些学者在其他双壳类, 如一种拍岸浪蛤 surf clam (*Spisula solidissima*) (Hiral, et al, 1988) 和一种蛤 Fingernail clam (*Sphaerium transversum*) (Fong et al, 1995) 得到证实; Fang et al (2002) 应用 5-HT 催产出长牡蛎精子和卵子, 使受精卵达到同步发育, 用于长牡蛎四倍体的培育。Pazos & Mathieu (1999) 报道了 5 种天然促性腺激素释放激素 (gonadotropin-releasing hormone, GnRH) 分布在长牡蛎和贻贝的性腺中。新近还发现 5-HT 和 GnRH 免疫活性物质定位在不同发育时期长牡蛎卵母细胞胞质、核膜和生殖被膜, 提示 5-

收稿日期: 2003-04-15; 接受日期: 2003-06-30
基金项目: 福建省重中之重资助项目
1. 通讯作者 (Corresponding author), Tel: 0592-2195277, E-mail: fant98@public.xm.fj.cn

HT 和 GnRH 可能参与调节长牡蛎卵母细胞发育和成熟（Fang et al，2003）。我们采用免疫细胞化学和双重染色技术，用 5-HT 和 GnRH 抗独特型抗体以及 5-HT 和 GnRH 抗体对长牡蛎卵母细胞进行定位和双染研究，确定不同发育时期卵母细胞上 5-HT 和 GnRH 及其受体的分布，并探讨了 5-HT 和 GnRH 在卵巢生理活动中可能的作用机制，同时为进一步探索 5-HT 催产长牡蛎排精卵和 GnRH 参与调节卵母细胞发育的作用机理提供形态学资料。

1　材料和方法

1.1　材　料

长牡蛎（*Crassostrea gigas*）采自厦门集美海区，贝龄 1～2 龄。从海区取回样品在实验室暂养数天后，剖开贝壳，小心仔细分离卵巢，分别取不同时期卵巢（Ⅰ～Ⅱ期，属小生长期；Ⅲ～Ⅳ期，属大生长期；Ⅴ期，属成熟期）切成数小块，投入新配制不含醋酸 Bouin 氏液中固定 15～24 h，梯度酒精脱水，石蜡包埋，切片厚 7 μm，裱贴在预先用多聚赖氨酸处理的载玻片上，用于免疫细胞化学定位。卵母细胞发育分期按 Fang et al（2002）标准确定，最后在低倍显微镜下挑选不同发育时期长牡蛎卵巢切片，用于受体定位和双重染色。

1.2　方　法

1.2.1　免疫细胞化学定位　不同时期长牡蛎卵巢切片经脱蜡水化后，入用蒸馏水配制的 3% H_2O_2 中 10 min，以除去内源性过氧化物酶活性。蒸馏水轻洗后，在 0.1 mol/L PBS（pH 7.2～7.4）浸泡 5 min，滴加 1∶10 正常山羊血清封闭液，在室温下孵育 10～20 min，以减少非特异性染色，后滴加第一抗体分别为兔抗 5-HT 抗独特型抗体（5-HTR）和兔抗哺乳动物 GnRH 抗独特型抗体（GnRH receptor，GnRHR），两种受体均由西安第四军医大学组胚教研室制备并通过鉴定（Huang et al，1994；Zhang et al，1998），分别为 1∶800 和 1∶400 稀释，在 4 ℃孵育 24 h，0.1 mol/L PBS 轻洗后，滴加生物素化羊抗兔 IgG（购自武汉博士德生物工程有限公司），1∶100 稀释，室温下孵育 20 min，0.1 mol/L PBS 轻洗三次，每次 2 min，滴加 ABC 复合物（Avidin-Biotin-Peroxidase Complex），1∶100 稀释，在室温下孵育 20 min。最后用 3',3' 二氨基联苯胺（diaminobenzidine）显色 10～30 min。

1.2.2　双重染色免疫细胞化学定位　切片脱蜡水化后，入 3% H_2O_2 甲醇溶液中 10 min，去除内源性过氧化物酶活性，然后按常规 ABC 免疫细胞化学程序进行。第一抗体为兔抗 5-HTR 与 GnRHR，分别用 1∶800 和 1∶400 稀释，采用两种不同显色系统的 BCIP 显色为深紫色；然后用兔抗哺乳类 GnRH 与 5-HT 抗体，分别以 1∶400 和 1∶800 稀释，用 AEC 显色为鲜红色，区别两种抗体的不同定位，有效地避免两种染色系统的相互影响。

对照片省去一抗，以正常兔血清或 PBS 替代 5-HT、5-HTR、GnRH 和 GnRHR，其余操作同上。

2　结　果

2.1　5-HT 和 GnRH 受体的定位

免疫细胞化学定位结果表明，5-HTR 和 GnRHR 定位在不同时期长牡蛎卵母细胞，免疫阳性物质沿胞膜分布。从小生长期发育至大生长期和成熟期，卵母细胞胞膜均对 5-HT 和 GnRH 抗独特型抗体显强的免疫阳性反应，核呈免疫阴性反应。另外，对比 5-HTR 和 GnRHR 在长牡蛎卵母细胞的定位，可见这两种 GnRHR 在不同时期卵母细胞表达的部位不同。5-HTR 在小生长期卵母细胞分布在胞膜与胞质（图 1A），而在大生长期则较多定位在胞膜和核膜（图 1B）。GnRHR 在不同发育时期均较多定位在胞膜（图 1C，1D）。以上两种受体的免疫反应强度在卵母细胞不同发育时期未见明显变化。对照显示免疫阴性反应。

2.2　5-HTR 与 5-HT 和 GnRHR 与 GnRH 双染定位

双重染色结果表明，5-HTR 与 5-HT 和 GnRHR 与 GnRH 均共存于不同发育时期的同一个卵母细胞，5-HTR 和 GnRHR 定位在长牡蛎卵母细胞的胞膜上，显示强的免疫阳性反应，显深紫色，而 5-HT 和 GnRH 则定位在同一细胞胞质，显鲜红色，核仍显免疫阴性反应（图 2A，2B）。对照仍显示免疫阴性反应。

3　讨　论

越来越多证据表明 GnRH 和 5-HT 不仅存在于脊椎动物和无脊椎动物神经系统（Huang et al，1991）、脑垂体和性腺（Fang et al，1999；Fang et al，2002；Fang et al，2003），而且已成为参与调节动物性腺发育（Weng et al，2000）、繁殖和生殖活动（Fang et al，1989；Peter & Yu，1997；Fang et

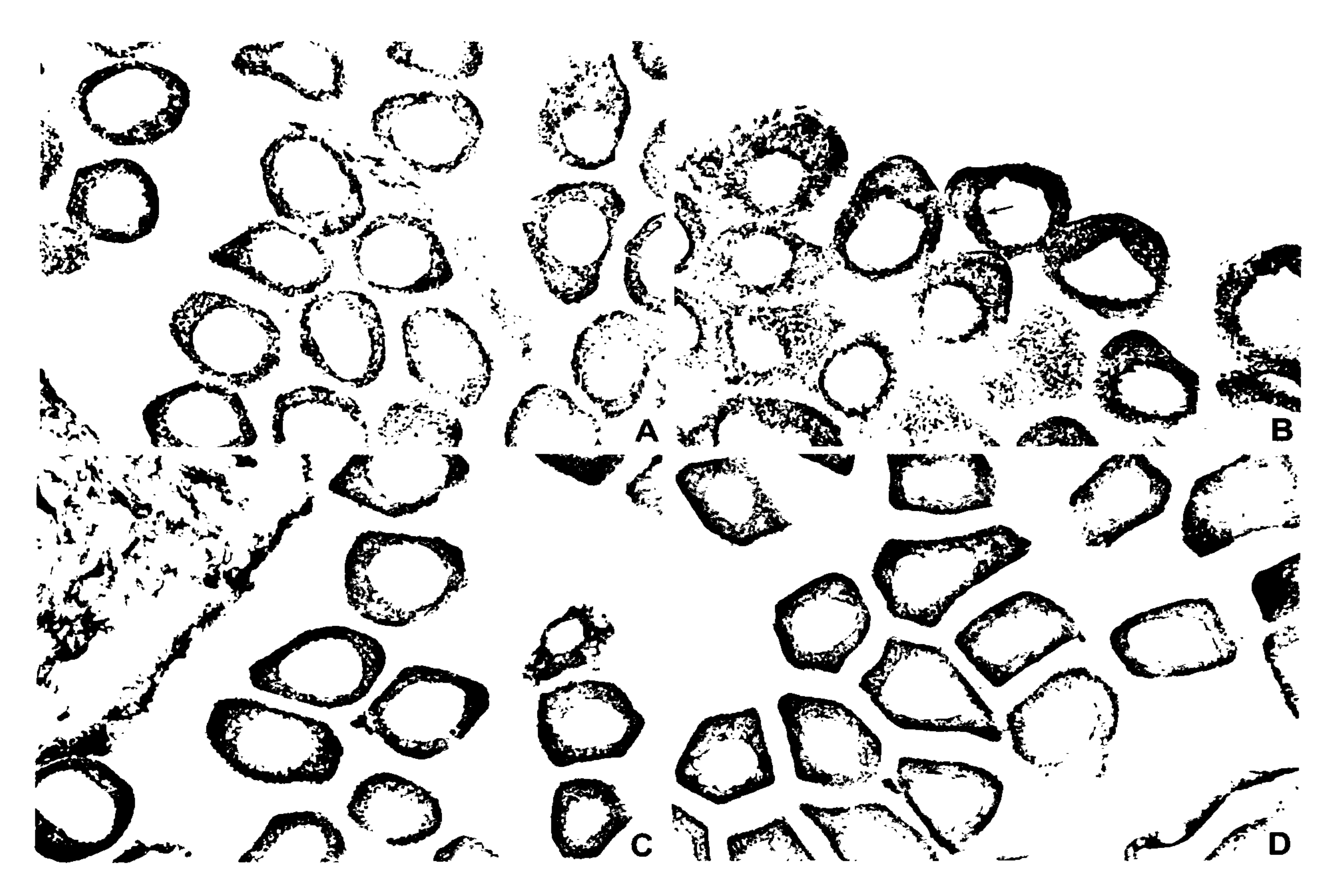


图 1 5-HT受体和GnRH受体在长牡蛎卵巢的定位

Fig.1 Localization of 5-HT receptor and GnRH receptor in the ovary of *Crassostrea gigas*

A. 5-HT受体定位在小生长期卵母细胞胞膜上（5-HT receptor was localized on the cell membrane of oocytes of small growth stage）×160；
B. 5-HT受体定位在大生长期卵母细胞核膜（箭头）和胞膜上［5-HT receptor was localized on the nuclear membrane (arrow) and cell membrane of oocytes in large growth stage］×160；
C. GnRH受体定位在大生长期卵母细胞胞膜上（GnRH receptor was localized on the cell membrane of oocytes in large growth stage）×160；
D. GnRH受体定位在成熟期卵母细胞胞膜上（GnRH receptor was localized on the cell membrane of oocytes in mature stage）×160。

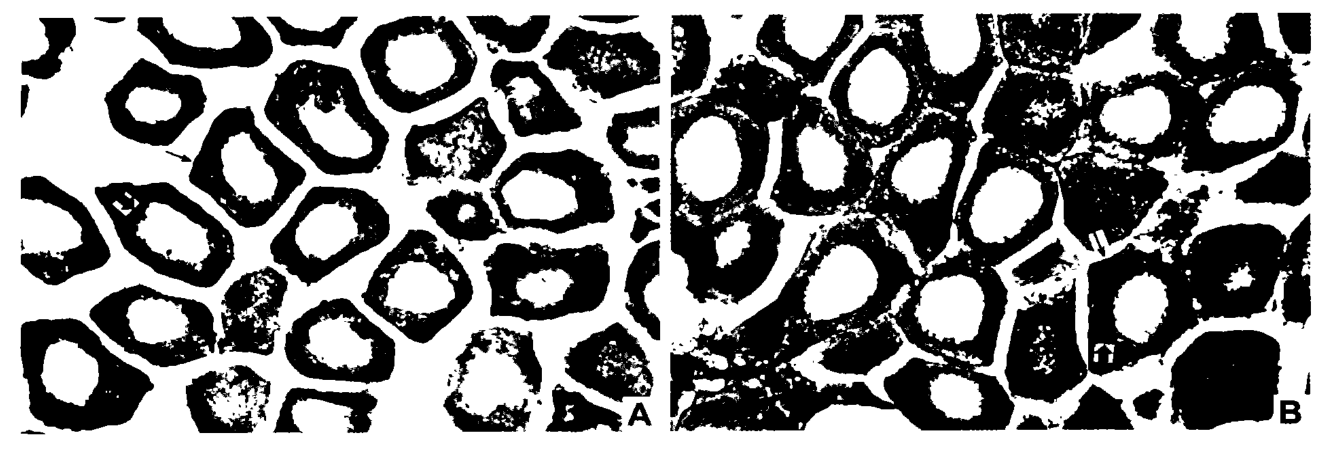


图 2 长牡蛎卵巢的双染定位

Fig.2 Double staining in the ovary of *Crassostrea gigas*

A. 5-HT及其受体定位在大生长期卵母细胞胞质（粗箭头）和胞膜（细箭头）上（5-HT and its receptor were localized on the cytoplasm (thick anow) and cell membrane (thin anow) of oocytes in the large growth stage）×160；
B. GnRH及其受体定位在大生长期卵母细胞胞质（粗箭头）和胞膜（细箭头）上（GnRH and its receptor were localized on the cytoplasm (thick anow) and cell membrane (thin anow) of oocytes in the large growth stage）×160。

al，1994；Fang et al，2002）的重要神经递质与调节肽。同时，对 GnRH 在脊椎动物和头索类的作用机制也有了较完整的了解。GnRH 首先与脊椎动物和头索类的脑垂体和哈氏窝相关靶细胞受体结合，刺激其释放促性腺激素，激发性腺发育成熟和产卵（Peter & Yu，1997；Habibi et al，1989；Fang et al，1999），或是 GnRH 直接与卵巢 GnRH 受体结合，刺激卵巢类固醇激素的产生，导致卵巢成熟和排卵（Pieper et al，1981；Fang et al，1994）。至于 GnRH 参与调节长牡蛎卵母细胞发育成熟的作用机制，我们认为有可能类似于头索类文昌鱼，也是通过与卵母细胞胞膜上的 GnRH 受体相结合，而后激发其生成性类固醇激素，刺激长牡蛎卵母细胞发育和成熟。理由是 De Longcamp et al（1974）证实在离体条件下贻贝（*Mytilus edulis* L.）卵巢能够合成类固醇物质；Reis-Henriques et al（1990）用气相色谱法进一步发现贻贝卵巢和精巢中存在孕酮、17β-雌二醇、雌酮、睾酮、雄烯二酮、5-二氢睾酮、雄烯二醇和雄酮。虽然尚未见长牡蛎性腺中存在类固醇激素的报道，但它与贻贝同属双壳类，不排除其存在的可能性。其次，关于 5-HT 诱导长牡蛎产卵和排精的机制，Fong et al（1993）用 5-HT 受体拮抗剂浸泡斑马贻贝，通过抑制 5-HT 而诱导其产卵，从而他们认为 5-HT 诱导产卵机制是通过其受体介导的，但在双壳类卵母细胞胞膜上是否存在 5-HT 受体，迄今未见报道。因此，本文首先用免疫细胞化学，尤其是双重染色技术证明，不同发育时期长牡蛎卵巢中卵母细胞均存在 5-HT 及其受体，Huang et al（1995）鉴定是 5-HT1 和 5-HT2 受体，为 5-HT 诱导长牡蛎产卵机制提供了新的形态学证据。我们的结果表明长牡蛎的卵母细胞不仅能产生 5-HT 和 GnRH，而且能表达 5-HT 和 GnRH 的受体，5-HT 和 GnRH 可能以自分泌的方式对卵母细胞起调节作用。现在我们还不明白的是 5-HT 与卵母细胞受体结合后，又是通过什么环节诱导长牡蛎卵巢排卵精巢排精，仍有待进一步深入研究。

致谢： 兔抗 5-HT 抗独特型抗体（5-HTR）和兔抗哺乳动物 GnRH 抗独特型抗体由西安第四军医大学组胚教研室黄威权教授惠赠。

参考文献：

Dahl E，Falck B，Mecklenburg C，Myhrberg H，Rosengren E. 1966. Neuronal localization of dopamine and 5-hydroxytryptamine in some mollusca [J]. *Z. Zellforsch*，**71**：489-498.

De Longcamp D，Lubet P，Drosdowsky M. 1974. The *in vitro* biosynthesis of steroids by the gonad of the mussel (*Mytilus edulis*) [J]. *Gen. Comp. Endocrinol*，**22**：116-127.

Fang Q，Dai YY，Fang YQ，Lin Q. 2002. Studies on the application of 5-hydroxytryptamine to stimulate oyster (*Grassostrea gigas*) to discharge sperm and egg in tetraploid inducement [J]. *J. Oceanography in Taiwan Strait*，**21**：68-71. [方　琦，戴燕玉，方永强，林　琪. 2002. 5-羟色胺刺激长牡蛎排放精卵在四倍体诱导中的应用. 台湾海峡，**21**：68-71.]

Fang Q，Fang YQ，Weng YZ，Dai YY. 2003. Distribution of NE-，DA-，5-HT-，and GnRH-like immunoreactive substance in the ovary of *Crassostrea gigas* [J]. *J. Oceanography in Taiwan Strait*，**22** (3)：299-302. [方　琦，方永强，翁幼竹，戴燕玉. 2003. 神经递质和调节肽免疫活性物质在长牡蛎卵巢中的分布. 台湾海峡，**22** (4)：299-302.]

Fang YQ，Qi X，Hong GY. 1989. Study of gonadotropin releasing hormone analogue induced spawning of amphioxus [J]. *J. Oceanography in Taiwan Strait*，**8**：278-280. [方永强，齐　襄，洪桂英. 1989. 促性腺激素释放激素类似物诱导文昌鱼产卵的初步研究. 台湾海峡，**8**：278-280.]

Fang YQ，Zhao WX，Lin QM. 1994. Hormonal regulation of oocyte development and maturation of amphioxus [J]. *Science in China* (*Series B*)，**37**：842-848.

Fang YQ，Huang WQ，Chen L. 1999. Immunohistochemical localization of gonadotropin-releasing hormone receptors (GnRHR) in the nervous system，Hatschek's pit and gonads of amphioxus，*Branchiostoma belcheri* [J]. *Chinese Sci. Bulletin*，**44**：908-912.

Fong PP，Wall DM，Ram JL. 1993. Characterization of serotonin receptors in the regulation of spawning in the zebra mussel *Dreissena polymorpha* (Pallas) [J]. *J. Exp. Zool.*，**267**：475-482.

Fong PP，Wall DM，Ram JL. 1995. Serotonin-induced parturition in the fingernail clam *Sphaerium* (*Musculium*) transversum (Say) [J]. *J. Exp. Zool.*，**272**：163-166.

Habibi HR，Marchant TA，Nahorniak CS，Loo HVD，Peter RE，Rivier JE，Vale WW. 1989. Function relationship between receptor binding and biological activity for analogs of mammalian and salmon gonadotropin-releasing hormones in the pituitary of goldfish (*Carassius auratus*) [J]. *Biol. Reprod.*，**40**：1152-1161.

Hiral S，Kishimoto T，Kadam AL，Kanatani H，Koide SS. 1988. Induction of spawning and oocyte maturation by 5-hydroxytryptamine in the surf clam [J]. *J. Exp. Zool.*，**245**：318-321.

Huang WQ，Fang YQ，Su HC，Qi X. 1991. Immunohistochemical localization of 5-HT in amphioxus [J]. *Chinese Sci. Bulletin*，**36**：329-332.

Huang WQ，Sun L，Wang RA，Wang BR，Xiong KH. 1995. Immunihistochemical identification on 5-HT anti-idiotypic monoclonal antibody and localization of 5-HT receptor [J]. *J. Fourth Milit. Univ.*，**16**：195-198. [黄威权，孙　岚，王瑞安，王百忍，熊抗辉. 1995. 5-羟色胺抗独特型抗体的免疫组织化学鉴定及 5-HT 受体定位的研究. 第四军医大学学报，**16**：195-198.]

Huang WQ，Zhang CL，Sun L. 1994. Preparation and identification of GnRH anti-idiotypic antibody [J]. *Chin. J. Anatomy.*，**17c** (suppl.)：353. [黄威权，张崇理，孙　岚. 1994. GnRH 抗独特型抗体的制备与鉴定. 解剖学杂志，**17c**（增刊）：353.

Matsutani T, Nomura T. 1982. Induction of spawning by serotonin in the scallop, *Patinopecten yessoensis* (JAY) [J]. *Mar. Biol. Lett.*, **3**: 353-358.

Matsutani T, Nomura T. 1984. Localization of monoamines in the central nervous system and gonad of the scallop, *Patinopecten yessoensis* [J]. *Bull. Jap. Soc. Fish*, **50**: 425-430.

Matsutani T, Nomura T. 1986. Serotonin-like immunoreactivity in the central nervous system and gonad of the scallp, *Patinopecten yessoensis* [J]. *Cell Tissue Res.*, **244**: 515-517.

Pazos AJ, Mathieu M. 1999. Effects of five natural gonadotropin-releasing hormones on cell suspensions of marine bivalve gonad stimulation of gonial DNA synthesis [J]. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **43**: 112-120.

Peter RE, Yu KL. 1997. Neuroendocrine regulation of ovulation in fishes: Basic and applied aspects [J]. *Review in Fish Biology and Fisheries*, **7**: 173-197.

Pieper DR, Richards JS, Marshall JC. 1981. Ovarian gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptors: Characterization, distribution, and induction by GnRH [J]. *Endocrinology*, **108**: 1148-1155.

Reis-Henriques MA, Le Guellec D, Remy-Martin JP, Aldessi GL. 1990. Studies of endogenous steroids from the marine mollusc *Mytilus edulis* L. by gas chromatography and mass spectrometry [J]. *Comp. Biochem. Physiol.*, **95B**: 303-309.

Weng YZ, Huang WQ, Fang YQ, Yao B, Sun L. 2000. Study on GnRH receptor (GnRHR) mRNA in situ hybridization in the nervous system, Hatschek's pit and gonad of amphioxus, *Branchiostoma belcheri* [J]. *Zool. Res.*, **21**: 437-441. [翁幼竹，黄威权，方永强，姚 兵，孙 岚. 文昌鱼神经系统、哈氏窝和性腺 GnRH 受体 mRNA 原位杂交的研究. 动物学研究, **21**: 437-441.]

Zhang FQ, Li ZP, Huang WQ, Sun L, Di XY, Zhao DH. 1998. Identification on function of 5-HT anti-idiotypic monoclonal antibody [J]. *J. Fourth Milit. Univ.*, **19**: 460-462. [张福琴，李志平，黄威权，孙 岚，帝新宇，赵德化. 1998. 5-羟色胺抗独特型抗体的功能鉴定. 第四军医大学学报, **19**: 460-462.]